

①9



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

①1 CH 669 670 A5

⑤1 Int. Cl.4: G 01 N 1/30
C 12 N 15/00

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

①2 **PATENTCHRIFT** A5

②1 Gesuchsnummer: 3760/84

②2 Anmeldungsdatum: 03.08.1984

③0 Priorität(en): 05.08.1983 US 520629

②4 Patent erteilt: 31.03.1989

④5 Patentschrift
veröffentlicht: 31.03.1989

⑦3 Inhaber:
Neal Lloyd First, Madison/WI (US)
Elizabeth Shea Critser, Middleton/WI (US)
Jan Karlotta Lohse, Madison/WI (US)

⑦2 Erfinder:
First, Neal Lloyd, Madison/WI (US)
Critser, Elizabeth Shea, Middleton/WI (US)
Lohse, Jan Karlotta, Madison/WI (US)

⑦4 Vertreter:
Dr. A. R. Egli & Co., Patentanwälte, Zürich

⑤4 **Verfahren zur Sichtbarmachung von genetischem Material von Säugetieren durch Anfärben und nach diesen Verfahren behandeltes Material.**

⑤7 Es wird ein Verfahren zur Sichtbarmachung von genetischem Material in lebenden Keimzellen, einzelligen befruchteten Eiern und im Stadium vor ihrer implantationsfähigen Phase befindlichen Embryozellen von Säugetieren beschrieben. Die Zellen werden mit einem fluoreszierenden Farbstoff oder Färbemittel inkubiert, worauf die angefärbte DNS sichtbar gemacht wird, indem man die Zellen ultraviolettem Licht aussetzt. Ein weiteres Verfahren betrifft das Anfärben der Vorkerne in lebenden pronucleären Zellen von Säugetieren.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Anfärben der DNS lebender Säugetierzellen, ausgewählt aus der aus Keimzellen; einzelligen befruchteten Eiern und im Stadium von ihrer implantationsfähigen Phase befindlichen Embryozellen bestehenden Gruppe, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgenden Verfahrensstufen aufweist:

(a) In Berührung Bringen der Zellen mit einem fluoreszierenden Färbemittel; und

(b) Inkubieren dieser Zellen, bis die DNS fluoresziert, wenn sie ultraviolettem Licht ausgesetzt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass diese Zellen oder Eier in einem Kulturmedium vorliegen.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das fluoreszierende Färbemittel aus der 4' 6-Diamidino-2-phenylindol und bis-Benzimidazolverbindungen enthaltenden Gruppe ausgewählt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Färbemittel in Form einer Lösung verwendet wird.

5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Dosierung des Färbemittels von 0,001 µg bis 10 µg je 50 µl der Kultur, welche die Säugetierzellen enthält, beträgt.

6. Säugetierzelle, ausgewählt aus der aus Keimzellen, einzelligen befruchteten Eiern, und im Stadium von ihrer implantationsfähigen Phase befindlichen Zellen von Embryonen bestehenden Gruppe, hergestellt nach dem Verfahren gemäss Anspruch 1.

7. Verfahren zum Anfärben der Vorkerne in lebenden pronucleären Zellen von Säugetieren, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgenden Verfahrensstufen aufweist:

(a) In Berührung Bringen lebender pronucleärer Zellen von Säugetieren mit einem fluoreszierenden Farbstoff; und

(b) Inkubieren dieser Zellen, bis die Vorkerne fluoreszieren.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die lebenden pronucleären Säugetierzellen einzellige befruchtete Eier von Rindern oder Schweinen sind.

9. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der fluoreszierende Farbstoff aus der 4' 6-Diamino-2-phenylindol und bis-Benzimidazolverbindungen enthaltenden Gruppe ausgewählt wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Dosierung des Farbstoffes in dem Färbemittel 0,001 µg bis 10 µg je 50 µl der pronucleären Zellen enthaltenden Kultur beträgt.

11. Lebende pronucleäre Zelle von Säugetieren, hergestellt nach dem Verfahren gemäss Anspruch 7.

12. Verfahren zum Entfernen von genetischem Material aus einer lebenden Säugetierkeimzelle, einem einzelligen befruchteten Säugetierei oder einer Zelle von im Stadium von ihrer implantationsfähigen Phase befindlichen Embryonen von Säugetieren, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgenden Verfahrensstufen aufweist:

(a) In Berührung Bringen von lebenden Zellen oder Eiern mit einem fluoreszierenden Farbstoff;

(b) Inkubieren bis das genetische Material bei der Bestrahlung mit ultraviolettem Licht fluoresziert;

(c) Entfernen des genetischen Materials aus diesen Zellen unter Anwendung einer Mikromanipulator-Technik.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen oder Eier in Suspension vorliegen.

14. Genetisches Material, hergestellt nach dem Verfahren gemäss Anspruch 12.

15. Verfahren zur Übertragung von genetischem Material in einen Vorkern einer lebenden pronucleären Säugetierzelle, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgenden Verfahrensstufen aufweist:

(a) In Berührung Bringen der Zelle mit einem fluoreszierenden Farbstoff;

(b) Inkubieren bis die Vorkerne fluoreszieren; und

(c) Übertragen des gewünschten genetischen Materials in einen Vorkern einer pronucleären Zelle mit Hilfe einer Mikromanipulator-Technik.

16. Genetisch veränderte lebende pronucleäre Säugetierzellen, hergestellt nach dem Verfahren gemäss Anspruch 15.

17. Verfahren zur Isolierung von genetischem Material und anschliessenden Übertragung desselben in einen Vorkern einer lebenden pronucleären Säugetierzelle, welches die folgenden Verfahrensstufen aufweist:

(a) In Berührung Bringen der das genetische Material enthaltenden Zelle mit einem fluoreszierenden Farbstoff;

(b) Inkubieren bis das genetische Material fluoresziert; und

(c) Entfernen des genetischen Materials mittels der Mikromanipulator-Technik,

(d) Übertragen des genetischen Materials in den Vorkern der lebenden pronucleären Säugetierzelle mit Hilfe der Mikromanipulator-Technik.

18. Verfahren zur Erzeugung einer photographischen Darstellung der Spermatozoenbewegung und eines Spurenusters, gekennzeichnet durch die folgenden Verfahrensschritte:

(a) In Berührung bringen von Spermazellen mit einem fluoreszierenden Färbemittel;

(b) Inkubieren bis die DNS in den Spermienköpfen fluoresziert, wenn sie ultraviolettem Licht ausgesetzt wird;

(c) Herstellen einer Zeitrafferphotographie des fluoreszierenden Spermiums.

BESCHREIBUNG

Die Erfindung bezieht sich auf Verfahren zum Anfärben der DNS lebender Säugetierzellen und auf nach diesen Verfahren behandeltes Material. Insbesondere wird durch das erfindungsgemässe Verfahren ein einmaliges Mittel zur Sichtbarmachung von 1. der Vorkerne von lebenden pronucleären Zellen, einschliesslich Eizellen und einzelliger befruchteter Eier, 2. der verdichteten DNS in den Kopfteilen von Spermatozoen und 3. der Zellkerne von im Stadium von ihrer implantationsfähigen Phase befindlichen Embryonen. Die Sichtbarmachung von genetischem Material in diesen Arten von lebenden Zellen ist für die weitere Untersuchung und für die Entwicklung von *in vitro* Befruchtung und Reifung, Gen- und Zellkernübertragungsmöglichkeiten und nachfolgendem Clonen von Embryonen von Haustieren von Bedeutung. Bisher konnten Vorkerne und Spermien-DNS in lebenden oder lebensfähigen Säugetierzellen, mit Ausnahme von denjenigen von Nagetieren und Menschen, bei denen das Cytoplasma dieser Zellen durchsichtig ist, nicht gesehen werden. Bei reiferen Embryonen kann der Bereich der Zellkerne etwas deutlicher sichtbar sein, durch die geringere Zellgrösse wird jedoch die Sichtbarmachung der individuellen Zellkerne unmöglich gemacht.

Im Bereich der Landwirtschaft, insbesondere der Viehzucht, werden fortgesetzt Versuche durchgeführt, eine Verbesserung der Gentechnik und der Auswahltechniken zu erreichen.

Unter besonderem Bezug auf Milchvieh konnte beispielsweise eine bemerkenswerte Zunahme der Milchproduktion aufgrund der in grossem Ausmass durchgeführten Verwendung von genetisch überlegenen Erzeugern und der künstlichen Besamung festgestellt werden. Milchkühe erzeugen heute nahezu zwei Mal soviel Milch wie vor 30 Jahren. Eine weitere genetische Verbesserung kann durch Multiplikation von überlegenen oder durch Clonen genetisch manipulierten Embryonen erreicht werden. Embryonen können geclont werden, indem man 1. Vorkerne oder Zellkerne in einer befruchteten Eizelle durch Spendervorkerne oder durch Zellkerne von mehrzelligen Embryonen in einem Frühstadium ersetzt oder 2. ein wertvolles Gen in den Vorkernen oder den Zellkern überträgt.

Zur Durchführung einer Genübertragung ist es notwendig, dass die Vorkerne oder Zellkerne der Empfängerzelle sichtbar sind, so dass die gewünschten Gensequenzen enthaltenden DNS-Fragmente direkt mittels Mikromanipulatorstechnik in einen der Vorkerne oder den Zellkern übertragen werden können. Andererseits erfordert die Zellkernübertragung, dass der Zellkern oder die männlichen oder weiblichen Vorkerne sichtbar sind, so dass sie von der befruchteten Zelle im Austausch mit einem Zellkern der gewünschten Clon-Linie entfernt werden können. Techniken, wie diese, welche die Manipulation von genetischem Material einschliessen, wurden im Zuge von Forschungsarbeiten mit Mäuseembryonen entwickelt, bei denen das Cytoplasma der Vorkerne und der Embryozellen durchsichtig ist, und eine Sichtbarmachung des Kernmaterials in lebenden Zellen durch Lichtmikroskopie erlauben.

Die Situation bei Rinder- und Schweinegameten sowie bei Zellen von Vorimplantierten Embryonen ist davon vollkommen verschieden. Das Cytoplasma dieser Zellen ist dicht und körnig und enthält dicke Lipidtröpfchen. Das genetische Material ist verdeckt und kann durch Lichtmikroskopie nicht sichtbar gemacht werden. Herkömmliche Zellkernfärbungen sind keine Vitalfärbungen, d.h. sie erfordern, dass die Zellen vor dem Anfärben fixiert und geklärt werden. Rinder- und Schweinegameten sowie Zellen von im Stadium von ihrer implantationsfähigen Phase befindlichen Embryonen wurden normalerweise in fixierten, geklärten und nicht lebenden Proben untersucht.

Wie im vorhergehenden erläutert, erfordern Verbesserungen in bezug auf die Gentechnik, wie beispielsweise die Übertragung von Genen oder Zellkernmaterial, die selektive Anfärbung des nucleären oder prä-nucleären Materials in lebenden Vorkernen oder embryonalen Zellen. Diese Techniken werden, zusammen mit einer Reihe von labormässigen Versuchsaufgaben, durch das erfindungsgemässe Verfahren möglich gemacht, durch welches ein Verfahren zum Sichtbarmachen geschaffen wird, welches die notwendige Selektivität gewährleistet und auf lebende Zellen angewendet werden kann.

Die hierin beschriebene Technik ermöglicht es, die männlichen und weiblichen Vorkerne in lebenden Säugetierzellen sichtbar zu machen, sogar im Falle solcher Arten, bei denen durch die Dichte des Zellcytoplasmas normalerweise die Vorkerne verdeckt werden. Die Sichtbarmachung von Vorkernen in lebenden Zellen ist bisher nicht beschrieben worden, mit Ausnahme für die Zellen von Nagetieren und Menschen. Durch das Verfahren wird ausserdem ein Mittel zur Sichtbarmachung des nucleären Materials von vielzelligen Embryonen geschaffen, indem ermöglicht wird, die Zahl der in einem sich entwickelnden Embryo vorhandenen Zellen nach jeder Teilung zu bestimmen, sowie das genetische Material für die Gen- und Kernübertragung zu manipulieren.

Die Sichtbarmachung wird erreicht, indem man lebende Zellen der Einwirkung eines Färbemittels oder Farbstoffes aussetzt, welche für die doppelstrangige DNS spezifisch sind, aber die weitere Lebensfähigkeit der Zelle nicht ausschliessen. Es werden fluoreszierende Färbemittel, wie DAPI oder bis-Benzimidazolverbindungen, verwendet. Das Färbemittel wird dem Kulturmedium zugesetzt, welches Gameten, einzellige befruchtete Eier oder vielzellige Embryonen enthält. Nach der Inkubation, welche nur eine kurze Zeit, wie einige Minuten, durchgeführt werden muss, kann das genetische Material sichtbar gemacht werden, indem man es ultraviolettem Licht aussetzt.

Die pronucleären oder nucleären Strukturen erscheinen als gefärbte Bereiche innerhalb des Cytoplasmas. Die Intensität schwankt von sehr blass bis zu heller Fluoreszenz.

Eine allgemeine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, labortechnische Forschungsaufgaben zu ermöglichen und zu erleichtern, wie beispielsweise Gen- und Kernübertragungstechniken, sowie Untersuchungen der Muster und des Fortschreitens der Reifung und Befruchtung von Eizellen *in vitro* sowie von Embryokulturen.

Eine der wesentlichen Aufgaben der Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Sichtbarmachung der Vorkerne von lebenden pronucleären Säugetierzellen zu schaffen.

Eine mehr spezifische Aufgabe besteht darin, die Sichtbarmachung der männlichen und weiblichen DNS oder von Vorkernen von lebenden Säugetiergameten und einzelligen befruchteten Eiern, insbesondere von Rindern und Schweinen, zu erlauben.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, ein ähnliches Verfahren zu schaffen, welches die Sichtbarmachung von Kernmaterial von vielzelligen Embryonen erlaubt.

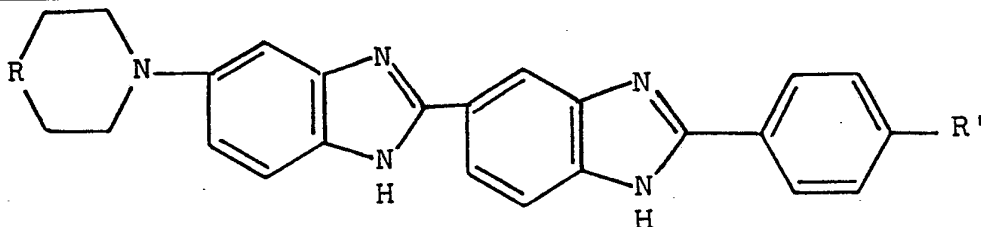
Eine damit in Verbindung stehende Aufgabe besteht darin, ein Mittel zur differenzierten Anfärbung von genetischem Material und den Cytoplasmahalten zu schaffen.

Durch das erfindungsgemässe Verfahren wird eine Färbetechnik geschaffen, die eine differenzierte Anfärbung bestimmten genetischen Materials erlaubt, welches niemals zuvor in lebenden Zellen sichtbar war. Die für diese Verfahren verwendeten fluoreszierenden Färbemittel bewirken eine selektive Färbung des genetischen Materials der Zellen, ohne dass es erforderlich wäre, die Zellen zu fixieren oder einer Klärung zu unterwerfen. Die Selektivität dieser Anfärbetechnik schafft ein machtvolles Forschungswerkzeug, welches weiterhin die Erforschung von Befruchtung, embryonaler Entwicklung und Gen- und Kernübertragung in Haustierembryonen erleichtert.

Die für das vorliegende Verfahren in Betracht kommenden Färbemittel können zur selektiven Anfärbung des genetischen Materials beliebiger Arten verwendet werden. Von höchstem Wert ist dieses Verfahren jedoch bei solchen Arten, bei denen die cytoplasmatischen Materialien (z.B. Lipide) das pronucleäre oder nucleäre Material im lebenden Zustand verdecken. Beispiele von beträchtlichem Interesse und beträchtlicher Bedeutung für die industrielle Viehzucht sind Rinder und Schweine. Es wird angenommen, dass sich das Verfahren auf andere Forschungen oder andere Haustiere gut anwenden lässt.

Es wurde gefunden, dass bestimmte fluoreszierende Färbemittel, wie sie für das vorliegende Verfahren zur Verwendung kommen in zweifacher Hinsicht nützlich sind, und zwar hinsichtlich der Selektivität des Anfärbens und hinsichtlich der fortgesetzten Lebensfähigkeit der Zellen. Fluoreszierende Färbemittel, die sogenannte «Vitalfärbemittel» darstellen, d.h. Färbemittel, die keine Fixierung und Klärung der Zellen erfordern und die kontinuierliche Entwicklung der Zelle nicht behindern, sind für das vorliegende Verfahren brauchbar. Darüber hinaus sollte das Färbemittel einem Typ angehören, der in die Zelle einverleibt und von der doppelstrangigen DNS in lebenden Keim- oder Embryonalzellen aufgenommen wird.

Als besonders nützlich für das vorliegende Verfahren haben sich Färbemittel erwiesen, die zu der Klasse der Benzimidazol-fluorenzfarbstoffe gehören. Diese Klasse von Verbindungen hat die folgende Grundstruktur:



Eine Reihe von Färbemitteln dieser Klasse ist von Hoechst AG, Frankfurt (BRD) erhältlich. Zu Verbindungen dieser Klasse zählen:

Hoechst Nr.	R	R'
32020	CH ₃ -N<	-Cl
32021	CH ₃ -N<	-OCH ₃
33258	CH ₃ -N<	-OH
33342	CH ₃ -N<	-OC ₂ H ₅
33662	C ₂ H ₅ -N<	-OCH ₃
34580	CH ₃ -N<	-N< CH ₃
38312	H-C<	-Cl
38317	H-C<	-NH ₂

Untersuchungen von S.A. Latt et al., «Spectral Studies on 33258 Hoechst and Related Bisbenzimidazole Dyes Useful for Fluorescent Detection of Deoxyribonucleic Acid Synthesis» in Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 23 (1976), Seiten 24-33, zeigen die Ähnlichkeit der oben aufgeführten Verbindungen und offenbaren, dass diese Verbindungen zum Nachweis der Synthese von DNS in somatischen Zellen nützlich sind.

Die folgenden Beispiele zeigen, dass die Färbemittel Hoechst Nr. 33258 und 33342 für das erfindungsgemäße Verfahren verwendbar sind. Der chemische Name des Färbemittels Hoechst Nr. 33258 ist 2-2-(4-Hydroxyphenyl)-6-benzimidazolyl-6-(1-methyl-4-piperazyl)-benzimidazol. Der chemische Name des Färbemittels Hoechst Nr. 33342 ist 2-2-(4-Äthoxyphenyl)-6-benzimidazolyl-6-(1-äthyl-4-piperazyl)-benzimidazol. Es wird erwartet, dass die verwandten bis-Benzimidazolverbindungen ebenfalls sämtlich für eine selektive Sichtbarmachung von genetischem Material in lebenden Keim- oder Embryonalzellen verwendbar sind.

Von den beiden tatsächlich untersuchten Verbindungen übertraf das Färbemittel Hoechst Nr. 33342 das Färbemittel Hoechst Nr. 33258 bedeutend und ist demnach das bevorzugte Reagens. Es wurde jedoch bemerkt, dass die Zellen verschiedener Arten unterschiedliche Färbemittel mit unterschiedlichem Wirkungsgrad aufnehmen. So wurde beispielsweise Hoechst Nr. 33258 von Mäuseembryonen schnell aufgenommen, während die Aufnahme bei Rinderembryonen sehr langsam erfolgte.

Es wird erwartet, dass andere fluoreszierende Färbemittel, welche den oben erwähnten Anforderungen genügen, d.h. DNS-bindende Fluorokrome, die für Vitalfärbungen verwendet werden können, für das vorliegende Verfahren ebenso gut verwendbar sind. Ein Beispiel hierfür ist DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindol), wobei die Verwendbarkeit jedoch nicht auf diese Verbindungen beschränkt ist.

Das Verfahren, durch welches das genetische Material in Gameten- oder Embryozellen angefärbt wird, umfasst im wesentlichen die folgenden Verfahrensstufen: Behandeln der Zellen mit einem geeigneten fluoreszierenden Färbemittel, Inkubation des so erhaltenen Materials und Bestrahlung mit ultraviolettem Licht. Die Dosierung des Färbemittels und die Dauer der Inkubation können variiert werden, in Abhängigkeit vom verwendeten Farbstoff und dem Zweck, für welchen die Sichtbarmachung erwünscht ist.

Bei der Anwendung dieser Färbetechnik wurden keine fal-

schen positiven Ergebnisse erhalten. Das bedeutet, dass bei diesem Verfahren keine anderen Materialien als nucleäre oder pronucleäre DNS in merklicher Weise angefärbt werden. Es wurde jedoch festgestellt, dass im Überschuss mit Färbemittel behandelte Zellen eine gewisse Hintergrundfärbung zeigen. Weiterhin wurde gefunden, dass das Verfahren zu einigen falschen Negativwerten führt, d.h. dass einige Zellen keine Fluoreszenz zeigen, bei denen mittels anderer Methoden festgestellt wurde, dass sie Zellkerne oder Vorkerne enthalten. Es wird jedoch nicht angenommen, dass dieser Sachverhalt die Nützlichkeit dieser Färbemethode unter Laborbedingungen oder in kommerziellem Rahmen behindert oder beeinträchtigt.

Eizellen (Oocyten), einzellige befruchtete Eier oder Embryonen im Stadium vor der implantationsfähigen Phase werden von geschlechtsreifen weiblichen Tieren mit Hilfe konventioneller Methoden, durch die die Gesundheit der Zellen bewahrt wird, gewonnen. Spermazellen (Spermatozoen) werden aus dem Ejakulat geschlechtsreifer männlicher Tiere oder aus exzidierten Hoden, Nebenhoden oder Teilen des männlichen Leitungssystems erhalten. Keimzellen oder Gameten (Oocyten und Spermatozoen) sind haploide Zellen, welche sich unter Bildung eines befruchteten Eies vereinigen. Das befruchtete Ei, welches die männlichen und weiblichen Vorkerne enthält, unterliegt dann einer Konjugation der Gameten (Verschmelzung der männlichen und weiblichen Vorkerne zur Erzeugung eines Zygotenkernes) worauf eine Reihe von Zellteilungen erfolgt. Während der Embryo eine Reihe von mitotischen Teilungen durchmacht, durchläuft er eine Entwicklung über die Morulaphase zur Blastocystenphase, wenn eine Gewebedifferenzierung und Spezialisierung stattfindet. Letzten Endes führt dies zur Bildung des Fötus und der Placenta, welche implantationsfähig sind und in die Uteruswand implantiert werden.

Im Brennpunkt des Interesses stehen der Embryo im Stadium vor der implantationsfähigen Phase sowie die Keimzellen und einzelligen befruchteten Eier. Diese sehr frühen Zellstadien sind das Objekt intensiver Forschungsanstrengungen. Die oben beschriebenen Gen- und Kernübertragungstechniken verwenden befruchtete Eizellen und Embryonalzellen im Frühstadium. Die Technik hat sich ausserdem als nützlich für andere embryologische Forschungen erwiesen.

So ermöglicht sie beispielsweise den Forschern, die Entwicklung von *in vitro* befruchteten Eiern zu studieren, z.B. die Symmetrie von Kern- und Cytoplasmateilung, das Auftreten eines einzelnen Kernes in jedem Blastomer, die Zahl der Zellen im Embryo nach jeder Teilung usw. Darüber hinaus ist sie für das Stadium der Gesundheit und der Beweglichkeit von Spermatozoen nützlich.

Die Keim- oder Embryonalzellen werden bevorzugt in einem Kulturmedium untergebracht, welches geeignet ist, die Gesundheit und Lebensfähigkeit der Zellen aufrechtzuerhalten. Das im Einzelfall für eine gegebene Anwendung zu bevorzugende Kulturmedium, z.B. für Zellen einer besonderen Art oder in einem besonderen Entwicklungsstadium, ist einem Fachmann bekannt. Verschiedene geeignete Medien sind in den Beispielen angegeben. Spermien können in Samen, in Samen mit herkömmlichen Auszugsmitteln, wie Eiweiss oder Milch oder in einem Kulturmedium untersucht werden.

Das Färbemittel wird bevorzugt in Form einer Lösung verwendet. Dies erlaubt eine genauere Einstellung der Dosierung und ermöglicht den Einsatz des Färbemittels in stark verdünnter Form. Es wird angenommen, dass niedrigere Dosierungen weniger Neigung zeigen, eine genetische Schädigung der Zelle zu verursachen.

Eine Stammlösung des Färbemittels kann unter Verwendung eines beliebigen geeigneten Lösungsmittels hergestellt werden. Dies bedeutet, dass jedes Lösungsmittel für das Färbemittel verwendbar ist, welches die lebenden Zellen nicht in schädlicher Weise beeinflusst. Als Beispiele sind zu nennen (ohne Ein-

schränkung auf die genannten Medien oder Lösungsmittel): Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS), TALP (Thyrode-Albumin-Lactat-Pyruvat)-Medium, Whittens Medium und Eagles Medium, oder andere Medien oder Lösungsmittel, welche mit der Fortsetzung der Lebensfähigkeit der Zellen verträglich sind. Die Stammlösung des Färbemittels sollte vorzugsweise bei Kühlschranktemperaturen aufbewahrt werden, vorzugsweise bei Temperaturen von etwa 0°C bis 4°C, um die Möglichkeit einer Verunreinigung zu vermindern. Es sollte jedoch beachtet werden, dass ein Einfrieren im allgemeinen nicht wünschenswert ist, da dies eine Ausfällung der Salze aus der Lösung verursacht.

Die Stärke (Konzentration) der Färbemittelstammlösung kann gewünschtenfalls variiert werden. Dabei gilt, dass eine stärkere Lösung genetisches Material in kürzerer Zeit anfärben wird, während eine schwächere Lösung eine längere Inkubationsdauer erfordert, bis das Material fluoresziert. Darüber hinaus verändert sich die Geschwindigkeit der Färbemittelaufnahme mit der jeweiligen Spezies, so verlangen beispielsweise Rinder- und Schweinezellen eine wesentlich längere Inkubationsdauer als Mäusezellen. Wie oben angegeben, werden niedrigere Dosierungen des Färbemittels bevorzugt, um die Gesundheit und die Lebensfähigkeit der Zellen zu bewahren.

Wird beispielsweise eine so kleine Menge wie 1 µl einer Stammlösung, welche 20 µg Färbemittel je ml DPBS enthält, in 49 µl eines einzelligen Mäuseembryonen enthaltenden Mediums (50 µl Gesamtvolumen) verwendet, so ist das Ergebnis eine ausgeprägte Fluoreszenz von Vorkernen und wenigstens einem polaren Körper innerhalb von 15 Minuten. Werden einzellige Rinderembryonen und eine Stammlösung mit einem Gehalt von 20 µg/ml Färbemittel verwendet, wobei die Dosierung 2 µl Stammlösung auf 48 µl Nährmedium, welches die Embryonen enthält, beträgt, so kommt es innerhalb von 30 Minuten zu einer Fluoreszenz von polaren Körpern, während die Vorkerne für 1 bis 2 Stunden nicht sichtbar sind. Wie unter Bezug auf die Beispiele gesehen werden kann, können die Dosis und die Inkubationsdauer variiert werden, sofern dies aufgrund verschiedener experimenteller oder anderer Zwecke erwünscht ist.

Die angefärbten Strukturen können unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden, indem man sie ultraviolettem Licht aussetzt, wobei Licht mit einer erregenden Wellenlänge bei annähernd 350 nm und einer Emission bei annähernd 460 nm als nützlich befunden wurden. Zellkerne und Vorkerne erscheinen als gefärbte blaue Bereiche innerhalb des Zellcytoplasmas. Spermien besitzen keine diskreten Vorkerne; die DNS befindet sich in dichter Packung im Kopfteil des Spermiums, wo sie mit Hilfe des vorliegenden Verfahrens sichtbar gemacht werden kann. Dort, wo auf Vorkerne Bezug genommen wird, ist die DNS der Spermien eingeschlossen, sofern nicht anderweitig angegeben. In Abhängigkeit von der von der DNS aufgenommenen Färbemittelmenge, welche eine Funktion der Dosis und der Zeit ist, variiert die Intensität von sehr schwach bis zu strahlender Fluoreszenz.

Die folgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der in den Patentansprüchen definierten Erfindung, ohne diese zu beschränken. Die in den Beispielen verwendeten Stammlösungen und Kulturbedien werden wie nachfolgend angegeben hergestellt:

Herstellung von Dulbecco's phosphatgepufferten Salzlösung (DPBS)

Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS) wurde wie folgt hergestellt:

Lösung 1	8,00 g NaCl
	0,20 g KCl
	1,15 g Na ₂ PO ₄
	0,20 g KH ₂ PO ₄
	800,00 ml deionisiertes, destilliertes Wasser

Lösung 2 0,10 g KCl₂
100,00 ml deionisiertes, destilliertes Wasser

Lösung 3 0,10 g MgCl₂
100,00 ml deionisiertes, destilliertes Wasser

Jede Lösung wurde getrennt in einem Autoklaven einer Dampferhitzung bei 120°C bis 125°C während 20 Minuten unterworfen und danach gekühlt. Die drei Lösungen wurden in einem Messkolben mit einem Liter Fassungsvermögen gemischt und das Gesamtvolumen mit in einem Autoklaven erhitzten deionisierten, destillierten Wasser auf einen Liter eingestellt. Die DPBS-Lösung wurde auf annähernd 4°C gekühlt.

Bei Verwendung der DPBS zum Waschen von Zellen, wurden zu jeweils 100 ml DPBS zuerst 5 mg (0,1 ml) Gentamycin-sulfat-Stammlösung zugegeben. Die Gentamycin-Stammlösung enthielt 50 mg Gentamycin-SO₄ je ml NaCl.

Herstellung von Färbemittel-Stammlösungen

Färbemittel-Stammlösungen unter Verwendung von Hoechst Nr. 33342 wurden mit den folgenden Konzentrationen hergestellt:

10 g/ml DPBS
20 g/ml DPBS
60 g/ml DPBS

Färbemittel-Stammlösungen unter Verwendung von Hoechst Nr. 33258 wurden mit den folgenden Konzentrationen hergestellt:

10 g/ml DPBS
20 g/ml DPBS

Die Färbemittel-Stammlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt.

Herstellung von TALP (Tyrode-Albumin-Lactat-Pyruvat)-Medium

Die Herstellung von Stammlösung zur Verwendung bei der Bereitung von TALP-Medium wurde wie folgt vorgenommen:

Bestandteil	Menge	In
NaCl	9,210 g	1,0 l H ₂ O
KCl	1,237 g	100 ml H ₂ O
CaCl ₂ (2H ₂ O)	1,332 g	100 ml H ₂ O
MgCl ₂ (6H ₂ O)	2,436 g	100 ml H ₂ O
NaHCO ₃	1,403 g + 1 mg Phenolrot	100 ml H ₂ O
Glucose	5,310 g	100 ml H ₂ O
Na-Lactat	1,0 ml DL-Milchsäure *	
NaH ₂ PO ₄ (H ₂ O)	28,0 mg	**

Anmerkungen:

* DL-Milchsäure, Natriumsalz als 60% Sirup (Sigma Chemical Co.). Die 1,0 ml Milchsäuresirup wurden in die 35 ml H₂O gespült, bis sie in Lösung waren. Ein Tropfen Phenolrot wurde zugegeben. Der pH wurde mit NaOH auf annähernd 7,4 eingestellt (wobei in Überschuss zugegebenes NaOH durch Hinzufügen eines sehr kleinen Tropfens Lactat korrigiert werden kann).

** Die 28 mg NaH₂PO₄ (H₂O) wurden mit 10 ml der wie oben beschrieben hergestellten Glucosestammlösung vermischt.

Die Bestandteile für jede Stammlösung wurden gemischt, sterilfiltriert (Porenweite 0,2 µm) in sterile Flaschen abgefüllt und bei etwa 4°C gekühlt.

Das TALP-Medium wurde vor dem Gebrauch durch Mischen der folgenden Mengen von Stammlösungen zubereitet:

Stamm	Stamm-Konzentration	Konz. im Medium	Menge
NaCl	157,0 mM	114,00 mM	ad 100 ml
KCl	166,0 mM	3,16 mM	1,90 ml
CaCl ₂ (2H ₂ O)	120,0 mM	2,00 mM	1,70 ml
MgCl ₂ (6H ₂ O)	120,0 mM	0,50 mM	0,41 ml
NaHCO ₃	167,0 mM	25,00 mM	15,00 ml
NaH ₂ PO ₄ (H ₂ O)	20,5 mM	0,35 mM	} zusammen 1,70 ml
Glucose	295,0 mM	5,00 mM	
Na-Lactat	150,0 mM	10,00 mM	6,70 ml

Die angegebenen Mengen wurden mit NaCl vermischt, wobei genügend NaCl verwendet wurde, um ein Endvolumen von 100 ml zu erhalten. Dann wurden 6,5 mg Penicillin (100 IE/ml) und 1,0 mg Phenolrot zugegeben. Die erhaltene Mischung wurde in sterile Flaschen steril filtriert (Porenweite 0,22 µm).

Am Tag des Gebrauchs wurde das TALP-Medium in Abhängigkeit von dem vorgesehenen Verwendungszweck, wie folgt ergänzt:

1. Medium für Befruchtung

6 mg Rinderserum Albumin (BSA), fettsäurefrei, und 10 µl Natrium-Pyruvat-Stammlösung je ml TALP wurden zugegeben und einer Sterilfiltration unterworfen (BSA from Sigma Chemical Co.) oder

2. Nährmedium für Reifung

Zu 4,5 ml TALP wurden 500 l Rinderfötusserum (10%), 50 µl NA-Pyruvat-Stammlösung und 10 mg FSH/ml TALP zugegeben und einer Sterilfiltration unterworfen.

Herstellung von Whittens's Medium

Bestandteil	Menge
NaCl	514,0 mg
KCl	36,0 mg
KH ₂ PO ₄	16,0 mg
MgSO ₄ (7H ₂ O)	29,0 mg
NaHCO	190,0 mg
Na-Pyruvat	3,5 mg
Ca-Lactat (5H ₂ O)	53,0 mg
Glucose	100,0 mg
K Penicillin	8,0 mg
Streptomycin SO ₄	5,0 mg

Das Medium wurde zubereitet, indem die aufgeführten Bestandteile in einen 100 ml Messkolben eingebracht wurden. Danach wurden 0,37 ml 60% Natriumlactatsirup (Sigma Chemical Co.) und 0,1 ml 1% Phenolrot zugegeben. Das Endvolumen wurde mit entionisiertem, destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Dann wurde das Medium einer Sterilfiltration unterworfen (Porenweite 0,22 µm) und bei 4°C aufbewahrt. Am Tage des Gebrauchs wurde das Medium durch Rinderserum Albumin (BSA) von Sigma Chemical Co. ergänzt, indem 1,5 mg BSA je ml Medium zugesetzt wurden.

Beispiel I

In diesem Beispiel wurden Mäuseembryonen verwendet um die Spezifität des Färbematerials für genetisches Material in lebenden einzelligen Embryonen nachzuweisen, da die Vorkerne dieser Spezies im ungefärbten Zustand sichtbar sind. Die Embryonen wurden von geschlechtsreifen weiblichen Mäusen erhalten, die in der vorangehenden Nacht befruchtet worden waren. Durch Entfernung der Cervix wurden die Tiere getötet, die Ovarien und Eileiter freigelegt und die einzelligen Embryonen gewonnen, indem man sie im Eileiter als vorgewölbten Bereich feststellte und die Eileiterwandung mit feinen Nadeln und feinen Scheren punktierte. Die Cumuluszellen wurden entfernt, indem man auf den freigelegten Bereich des Eileiters 100-200 µl Hyaluronidase-Lösung (10 mg/ml DPBS) aufbrachte und dort 10 Minuten lang verweilen liess. Die einzelligen Embryonen wurden durch Pipettieren gewonnen und 3 Mal in einer Lösung von 3 mg Rinderserum-Albumin pro ml DPBS gewaschen, bevor sie in Whitten's Medium eingetragen wurden. Das Rinderserum-Albumin wurde von Sigma Chemical Co. erhalten. Einzelne Tropfen Whitten's Medium wurden in einer Petrischale plaziert. Die Tropfen wurden ausgestrichen, um sie zum Anhaften an der Platte zu bringen, worauf sie mit Öl beschichtet wurden. Die einzelligen Vorkerne wurden dann in den Tropfen untergebracht. Die Vorkerne wurden mit Hilfe der Lichtmikroskopie sichtbar gemacht, bevor sie unter Anwendung des erfindungsgemässen Verfahrens angefärbt wurden.

Für dieses Beispiel wurde eine Färbemittelstammlösung von Hoechst Nr. 33342, Konzentration 20 µg/ml, verwendet. Es war erwünscht, den einzelligen Embryonen Dosen der Färbemittelstammlösung von 0,1 µl, 2 µl, 5 µl oder 10 µl bei einem Gesamtmedium-Embryo-Färbemittel-Volumen von 50 µl je Tropfen zuzugeben. Es war deshalb notwendig die Tropfen, welche Medium und Embryo enthielten, in einer Grösse aufzubringen, welche die Anpassung der gewünschten Färbemitteldosis ermöglichte. D. h. für eine Färbemitteldosis von 1 µl betrug die Medium/Embryomenge 49 µl, bei einer Färbemitteldosis von 2 µl dementsprechend 48 µl. Die Embryonen wurden bei 37°C, bei einem pH von 7,2 in einem Gemisch von 5% CO₂ in Luft gefärbt. Sie wurden in dem Färbemittel belassen, während sie sichtbar gemacht wurden. Die Vorkerne und polaren Körper der einzelligen Mäuseembryonen wurden unter Verwendung eines Nikon Epifluoreszenzzusatzgerätes Nr. TMD-ED für Inverted Microscope DIAPHOT-TMP (Nikon) sichtbar gemacht. Dieses System verwendet eine Hochdruckquecksilberdampfampe. Die verwendeten UV-Filter wurden von Nikon erhalten. Dieses System erlaubt die gleichzeitige Sichtbarmachung mit Licht und Fluoreszenz, so dass es möglich war, die Fluoreszenzbereiche, wie die Vorkerne und polaren Körper, positiv zu identifizieren. Sämtliche 66 in dieser Weise angefärbten Embryonen zeigten bestimmte Fluoreszenz sowohl von Vorkernen als auch von wenigstens einem polaren Körper innerhalb von 15 Minuten seit Beginn der Einwirkung des Färbemittels, unabhängig von der Dosierung. Häufig wurde nur ein polarer Körper sichtbar, während der zweite polare Körper im Laufe der Zeit degenerierte. Danach wurden 24 einzellige Mäuseembryonen in der gleichen Weise wie oben beschrieben angefärbt, wobei nur die niedrige Dosis verwendet wurde (1 µl Färbemittelstammlösung für 1 Tropfen von 49 µl Medium/Embryo). Von diesen 24 Embryonen, zeigten 23 eine Fluoreszenz innerhalb von 5 Minuten nach dem Anfärben.

Beispiel II

Die Arbeitsvorgänge von Beispiel I wurden wiederholt, wobei einzellige Hamsterembryonen und eine Dosierung von 10 µl Färbemittelstammlösung bei einem Gesamttropfenvolumen von 50 µl verwendet wurden. Der erste polare Körper zeigte nach 5 Minuten, nachdem er dem Färbemittel ausgesetzt war, eine Färbung. Die Vorkerne zeigten bis zu einer Einwirkungszeit von 30 Minuten

ten keine Fluoreszenz. Um eine vollständige Sichtbarmachung der beiden Vorkerne und wenigstens eines polaren Körpers in jedem Ei sichtbar zu machen, wurden bis zu 45 Minuten Einwirkungsdauer benötigt. Wie in Beispiel 1 wurden nicht immer beide polaren Körper angefärbt.

Beispiel III

Die Arbeitsvorgänge von Beispiel I wurden wiederholt, wobei reife Rinderoocyten, einzellige und zweizellige Embryonen verwendet wurden. Die Ovarien wurden aus einem Schlachthaus erhalten. Die Oocyten wurden aus den Follikeln abgesaugt. Die Cumuluszellen wurden vor dem Anfärben mit Hyaluronidase und Pipettieren, wie in Beispiel I, entfernt. Einige der gewonnenen Oocyten wurden, wie unten beschrieben wird, zum Anfärben und einige zur *in vitro* Befruchtung verwendet. Die Oocyten wurden während 24 Stunden bei 39° C in einem TALP-Nährmedium inkubiert und dann zusammen mit durch Ejakulation gewonnenem Bullensamen in TALP-Nährlösung zur Befruchtung inkubiert. Einzellige befruchtete Einzellen wurden nach der 24 Stunden dauernden Inkubation gewonnen, in DPBS-Gentamycin-Lösung gewaschen und erneut in frischer TALP-Nährlösung suspendiert. Zweizellige Embryonen wurden in der gleichen Weise präpariert, wobei die Gewinnung nach 48 Stunden dauernder Inkubation mit Sperma und Nährlösung vorgenommen wurde. Danach wurden sie gewaschen und erneut in frischer Nährlösung suspendiert.

Für dieses Beispiel wurde eine Färbemittelstammlösung verwendet, welche 20 µg Hoechst Nr. 33342 je ml DPBS enthielt. Die Arbeitsvorgänge von Beispiel I wurden wiederholt, wobei Färbemitteldosierungen von 2 µl und 5 µl Färbemittel je 50 µl Gesamtvolumen/Medium-Embryo-Färbemittel verwendet wurden. Die Färbemittel-Kultur-Mischungen wurden bei 39° C inkubiert, auf Objektträgern befestigt und mit Deckgläsern abgedeckt. Die so hergestellten Präparate wurden unter Umgebungsbedingungen sichtbar gemacht. Innerhalb von 30 Minuten, nachdem das Färbemittel zugegeben worden war, waren polare Körper sichtbar. Die Vorkerne der Oocyten und einzelligen Embryonen und die Kerne der zweizelligen Embryonen waren nach 1 bis 2 Stunden oder mehr sichtbar.

Die angefärbten Zellen wurden dann montiert, fixiert und geklärt, um eine Überprüfung des vorhandenen Chromatins zu ermöglichen. Die Objektträger mit den angefärbten Embryonen und Oocyten wurden in Entwicklerschalen, welche annähernd 40 ml Eisessig: Äthanol (1:3 (Volumen/Volumen)) untergebracht und über Nacht bei Raumtemperatur zur Klärung stehen gelassen. Chromatin wurde mit 1%-iger (Gewicht/Volumen) Aceto-Orceinlösung (1 % Orcein-Farbstoff in 40:60 Wasser-Eisessigsäurelösung) angefärbt. Das Chromatin wurde durch Lichtmikroskopie unter Verwendung einer Nemarsky- und Phasenoptik sichtbar gemacht.

Es wurde gefunden, dass annähernd 15 % der Oocyten und frühen einzelligen Embryonen Metaphase-Platten oder Vorkerne enthielten, obgleich sie keine Fluoreszenz nach der Behandlung mit den bis-Benzimidazol-färbemitteln zeigten. Bei den zweizelligen Embryonen wurden keine Beispiele festgestellt, bei denen die Kerne keine Fluoreszenz zeigten. Das Färbemittel ergab keinerlei falschen Positivwerte. Bei allen Embryonen, die eine Fluoreszenz zeigten, wurde festgestellt, dass sie Chromatin enthalten, wenn sie nach der zweiten Methode untersucht wurden. Das Chromatin war in einer der folgenden Form vorhanden:

(1) Gestreute oder Metaphaseplatten für Oocyten (einschließlich Keimbläschen bei unreifen Oocyten), (2) Vorkerne bei befruchteten Einzellen, (3) Zellkerne bei Embryonalzellen oder (4) verdichtete Spermienkopfteile, welche in den Oocyten eingedrungen waren, bei denen jedoch keine normale Dekondensation zur Bildung des männlichen Vorkerns stattgefunden hatte.

Beispiel IV

Die grundlegenden Arbeitsvorgänge von Beispiel III wurden wiederholt, wobei Schweineoocyten, einzellige befruchtete Eier und zweizellige und vierzellige Embryonen verwendet wurden. Die Oocyten wurden von trächtigen Sauen durch chirurgische Spülung der Eileiter gewonnen und in TALP-Nährlösung suspendiert. Wie in Beispiel I wurde eine Färbemittelstammlösung von Hoechst Nr. 33342 mit einer Konzentration von 60 g/ml verwendet. Die Dosierungen betrugen 0,1 µl, 5 µl und 10 µl je 50 µl Gesamtvolumen des Gemisches aus Medium, Embryo und Färbemittel. Diese Mischungen wurden während 3 Stunden bei 39° C inkubiert. Die Metaphaseplatten und polaren Körper der Oocyten, die nicht befruchtet worden waren, und die befruchteten Eier zeigten eine sehr ausgeprägte Färbung, während das Erscheinungsbild der Vorkerne weniger ausgeprägt war. Darüber hinaus zeigten Spermienkopfteile, die die umgebenden Schichten der Oocyten durchdrungen hatten, eine Fluoreszenz. Die Zellkerne zweizelliger und vierzelliger Embryonen zeigten eine sehr ausgeprägte Fluoreszenz. Es wurde gefunden, dass eine Dosierung von 10 µl eine starke Hintergrundfärbung erzeugte.

Die angefärbten Zellen wurden montiert, fixiert und einer Klärung unterworfen, wie in Beispiel III beschrieben, mit der Ausnahme, dass sie in Eisessig/Äthanol während 48 Stunden einer Klärung unterworfen wurden. Die Ergebnisse waren ähnlich denjenigen in Beispiel III. Ungefähr 40 % der Oocyten und einzelligen Embryonen zeigten keine Fluoreszenz, obgleich keine falschen positiven Werte beobachtet wurden. Die vielzelligen Embryonen wurden routinemässig mit dem Hoechst Färbemittel angefärbt.

Beispiel V

Die Entwicklung von Embryonen, welche dem Hoechst Färbemittel Nr. 33342 ausgesetzt waren, wurden unter Verwendung von Mäuseembryonen im zweizelligen Stadium und in der Morulaphase untersucht. Die Embryonen wurden in der gleichen Weise erhalten und zubereitet wie in Beispiel I beschrieben. Sie wurden mit 10 µl Dosen einer Färbemittellösung (Konzentration 20 µg/ml) was eine Dosierung von 0,2 µg je 50 µl des gesamten Tropfenvolumens ergab, angefärbt.

Die Embryonen wurden der Einwirkung des Färbemittels während 15 Minuten unterworfen. Danach wurden die Embryonen 3 Mal in DPBS-Gentamycin gewaschen und in Whitten's Medium gezüchtet.

Von 26 zweizelligen Mäuseembryonen, die der Einwirkung des Färbemittels ausgesetzt waren, entwickelten sich 16 oder 65% bis zur Morulaphase. Dies steht im Vergleich mit 21 von 26 Kontrollversuchen (80 %) bei denen die Embryonen keinem Färbemittel ausgesetzt wurden, d.h. sie wurden während 15 Minuten mit einer Dosis von 10 l DPBS allein inkubiert.

Wenn in der Morulaphase befindliche Embryonen dem Färbemittel ausgesetzt wurden, entwickelten sich 23 von 44 (51 %) zu Blastocyten. Die Kontrollversuche (DPBS allein) zeigten eine Entwicklung zu Blastocyten von 23 von 31 (74 %).

Beispiel VI

Die grundlegenden Arbeitsgänge von Beispiel I wurden wiederholt, wobei Färbemittelstammlösungen (Hoechst Nr. 33258) von 10 µg je ml und 20 µg je ml verwendet wurden, um einzellige Mäuseembryonen anzufärben. Die Dosierungen betrugen 0,5 µl und 10 µl auf ein Gesamtvolumen Medium-Embryo-Färbemittelpräparat von 50 µl. Die Embryonen wurden unter Umgebungsbedingungen während einer halben Stunde angefärbt, bevor sie untersucht wurden. Die Vorkerne und polaren Körper zeigten eine Fluoreszenz und wurden mittels Lichtmikroskopie wie in Beispiel I positiv identifiziert. Es wurde gefunden, dass die Dosis von 10 µl dieses Färbemittels nicht routinemässig eine Überfärbung oder Hintergrundfärbung verursachte.

Beispiel VII

Rinderspermatozoen wurden mit Hoechst Färbemittel Nr. 33342 angefärbt, um die Spermienbeweglichkeit und die Spurenmuster zu untersuchen. Frisch ejakulierte Bullensamen wurden mit DPBS gewaschen und zentrifugiert. Die resultierenden Pellets wurden in TALP-Medium suspendiert und der Einwirkung einer Färbemittelstammlösung (Hoechst Nr. 33342) mit einer Konzentration von 20 µg/ml und einer Dosierung von 3 µl/50 µl ausgesetzt. Die Mischung aus Medium, Sperma und Färbemittel wurde während 15 Minuten bei 39°C inkubiert und beobachtet.

Nach dem Anfärben wurden die fluoreszierenden Spermien unter Verwendung des Nikon Fluoreszenzsystems, beschrieben in Beispiel I, sichtbar gemacht. Im optischen System des Mikroskops wurde eine Kamera verwendet, um farbige Zeitrafferphotographien bei Expositionszeiten von 10 bis 20 Sekunden aufzunehmen. Die durch die fluoreszierende DNS erzeugten Spuren auf den entwickelten Photographien wurden analysiert, um Geschwindigkeit und Muster der Spermienbeweglichkeit zu analysieren. Die Arbeitsweise wurde wiederholt, wobei Cumulus-Oocyten-Komplexe dem Medium beigelegt wurden. Die erhaltene Photographie wurde analysiert, um die Wirkung dieser Zellen auf Spermienbeweglichkeit, -geschwindigkeit und -muster festzustellen.

Beispiel VIII

Dieses Beispiel wurde durchgeführt, um die Spaltung in Schweineembryonen verschiedener Phasen zu beobachten. Die Embryonen wurden aus den Fortpflanzungswegen von Sauen mit übermäßig rascher Ovulation 48 bis 120 Stunden nach dem Einsetzen der Brunst gewonnen. Die Fortpflanzungswege wurden nach dem Schlachten gewonnen und im Laboratorium zum Entfernen der Embryonen gewaschen. Die so gewonnenen Embryonen lagen als einzellige Embryonen (48 Stunden) bis zu

vielzelligen Morula-Embryonen (120 Stunden) vor. Nach zweimaligem Waschen in einer DPBS-BSA-Lösung, wurden die Embryonen entweder in Whitten's Medium (Kontrollversuch) kultiviert oder angefärbt und dann in Whitten's Medium kultiviert.

Für dieses Beispiel wurde die Färbemittelstammlösung (Hoechst Nr. 33342) mit einer Konzentration von 60 µg/ml verwendet. Die Embryonen wurden während einer Stunde bei 39°C in 1,5 oder 10 µl Färbemittellösung je 50 µl inkubiert. Danach folgten drei je 30 Minuten dauernde Waschungen in sauberen DPBS (1,5 mg/BSA/ml). Die gewaschenen Embryonen wurden während 24 Stunden in Whitten's Medium (1,5 mg/BSA/ml) kultiviert und dann ausgewertet, um das Entwicklungsstadium festzustellen (Vollendung der Spaltungsteilung). Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

TABELLE I

Phase	Dosis			
	Kontrollversuch	1 µl	5 µl	10 µl
1-2-zellig	6/12(50%)	—	2/14(14%)	1/12(8.3%)
4-zellig	28/36(77%)	17/27(62%)	14/37(37%)	—
vielzellig	15/16(94%)	—	13/23(56%)	—

Die Prinzipien, bevorzugten Ausgestaltungen und Arbeitsweisen entsprechend der vorliegenden Erfindung, sind im vorhergehenden beschrieben worden. Die beschriebenen Ausführungsformen dienen jedoch nur zur Erläuterung der Erfindung in nicht einschränkender Weise. Abwandlungen und Änderungen liegen im Bereich fachmännischen Könnens, ohne vom Erfindungsgedanken abzuweichen.